

## SELECTED PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAW COW'S MILK

Jana Bezeková, Monika Lavová, Miroslav Kročko, Margita Čanigová

### ABSTRACT

For the identification of lactic acid bacteria derived from raw cow's milk, 151 colonies were isolated. The grow conditions of lactic acid bacteria were at temperature 37 °C for 3 days on MRS medium. Based on microscopical preparation, negative catalase and Gram-positive test were 81 isolates confirmed as genus *Lactobacillus*. Out of these, 9 isolates were evaluated for acidifying activity in UHT milk at 25 °C, 30 °C and 37 °C at regular intervals during 24 hours. The average count of NSLAB lactobacilli in raw cow's milk reached the value  $1.54 \cdot 10^4$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. It was found that all tested strains of lactobacilli did not cause significant changes of titratable acidity in milk at 25 °C and 30 °C. Only one strain significantly improved the titratable acidity of milk at 37 °C after 24 hours. The acidity reached the value from 7.5 °SH to 41.9 °SH. This strain was confirmed by PCR method as *Lactobacillus helveticus*.

**Keywords:** lactic acid bacteria, *Lactobacillus* sp., PCR, acidifying activity

### ÚVOD

Mikroflóra syrov môže byť rozdelená do dvoch hlavných skupín t.j. zákvasové baktérie mliečného kysnutia tzv. LAB a sekundárna mikroflóra, ktorej súčasťou sú aj nezákvasové baktérie mliečného kysnutia – NSLAB. NSLAB tvoria zvláštnu skupinu baktérií mliečného kysnutia, ktoré sa prirodzene vyskytujú v mlieku a v prostredí. Do mlieka sa dostávajú sekundárnou kontamináciou napr. z podlahy, z kanalizácie a z povrchov zariadení používaných v mliekarenskom prostredí (Fox et al., 2004).

NSLAB komplex zahŕňa štyri hlavné skupiny baktérií, pričom najvýznamnejšie zastúpenie majú mezofilné laktobacily (Smith, 2003). V dnešnej dobe sa niektoré druhy laktobacilov používajú ako probiotiká v komerčne dostupných potravinách a sú dôležitou súčasťou črevnej mikroflóry ľudí a zvierat (Baele et al., 2002). Sánchez et al. (2006) zo 628 izolátov mliečnych baktérií zaradili do rodu *Lactobacillus* 39,5 % izolátov. Bertier et al. (2001) z celkového počtu 488 izolátov mezofilných laktobacilov zo vzoriek mlieka potvrdili prevládajúce druhy *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Rod *Lactobacillus* vyvoláva v mlieku jeho prirodzené kysnutie (Tůma, Plocková, 2007). Baktérie, ktoré majú schopnosť produkovať v mlieku pri teplote 30 – 37 °C za 6 hodín toľko kyseliny mliečnej, ktorá zníži kyslosť mlieka z pôvodného pH asi 6,8 na hodnotu pH < 5,3 sa považujú za zákvasové baktérie mliečného kysnutia (Görner, Valík, 2004). NSLAB sa môžu používať ako doplnkové kultúry v syrárstve.

Obsah NSLAB v polotvrdom syre ihneď po lisovaní je obvykle menší ako 1 KTJ.g<sup>-1</sup>. Počas zrenia polotvrdých syrov sa populácia NSLAB zvyšuje a dosahuje vysoké počty, zatiaľ čo zákvasové baktérie postupne odumierajú. Na začiatku zrenia (po dvoch týždňoch) je najčastejšie obsah NSLAB 10<sup>2</sup> – 10<sup>3</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. Do troch mesiacov môžu

vzrásť na 10<sup>5</sup> – 10<sup>7</sup> KTJ.g<sup>-1</sup> (Tůma, Plocková, 2007). Ich počet môže počas zrenia syrov vzrásť až na 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> KTJ.g<sup>-1</sup> (Hoorde et al., 2010). Počty 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> KTJ.g<sup>-1</sup> zostávajú na tejto úrovni počas zrenia syrov po dobu minimálne 5 mesiacov (Bertier et al., 2001).

V polotvrdých syroch bola dokázaná prítomnosť druhov *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* a *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (Wouters et al., 2002, Hoorde et al., 2008).

NSLAB majú pozitívny vplyv na senzorické vlastnosti výrobkov, prispievajú predovšetkým k rozvoju chuti syrov (Thage et al., 2005). Pri výrobe a zrení syrov zohráva dôležitú úlohu proteolýza kazeínu, počas proteolýzy z aminokyselín vznikajú prekurzory špecifických zložiek, ktoré dávajú syrom typickú chuť napr. alkoholy, aldehydy, estery, kyseliny (Kholif et al., 2011). Sledovaním vlastností laktobacilov napr. proteolytickou aktivitou, lipolytickou aktivitou, autolýzou sa zaoberali Garabal et al., (2008), Nieto-Arribas et al. (2009). Je preto snahou presne identifikovať izoláty NSLAB a preskúmať ich vlastnosti. Problematikou identifikácie sa zaoberali napr. Cagno et al. (2006) a Kaleta et al. (2009) s použitím metód PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-analysis), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Cieľom práce bolo izolovať, identifikovať mliečne baktérie a preštudovať ich vybrané vlastnosti.

### MATERIÁL A METÓDY

#### Izolácia laktobacilov

Prítomnosť NSLAB sa zisťovala v cisternových vzorkách surového kravského mlieka a vo vzorkách

mlieka z mliečného automatu. V odobratých vzorkách mlieka sa stanovil počet laktobacilov kultiváciou na MRS agare (HiMedia Laboratories, India) pri teplote  $37 \pm 1$  °C po dobu 72 hodín za anaeróbných podmienok.

#### Rodová identifikácia laktobacilov

Baktérie rodu *Lactobacillus* vytvárajú na MRS médiu charakteristické kolónie, t.j. biele, šošovkovité až hviezdicovité kolónie o priemere 1 až 3 mm. Počítateľné počty laktobacilov sa pohybujú v rozmedzí  $15 - 150$  KTJ.ml<sup>-1</sup> (STN ISO 15214, 2002).

Vybrané kolónie laktobacilov vyrastené na živom médiu MRS sa preočkovali čiarovaním na platne MRS agar. Mikroskopicky sa pomocou natívneho preparátu zistila ich morfológia. Laktobacily sú grampozitívne paličky samostatné resp. vytvárajúce retiazky a sú katalázanegatívne.

#### Druhá identifikácia laktobacilov

Druhá identifikácia izolátu č. 62 sa vykonala pomocou komerčnej biochemickej súpravy API 50 CHL (BioMérieux, France). K identifikácii sa použila 24 hodinová kultúra, z ktorej sa pripravila suspenzia s turbiditou rovnou 2. stupňu McFarlandovej zákalovej stupnice na prístroji Densilameter (Lachema, Česká republika). Inkubácia, identifikácia a vyjadrenie výsledkov sa uskutočnilo podľa návodu testu. Tento izolát druhovo určený komerčným biochemickým testom sa potvrdil PCR metódou podľa Fortina et al. (2001). Z vyrastených kolónií mliečnych baktérií na MRS médiu sa vybrané kolónie použili na 24 hodinovú kultúru a nechali sa pomnožiť v MRS bujóne. Po odobratí sa bakteriálne bunky premyli 2-krát PBS roztokom a izolácia DNA sa uskutočnila prístrojom QuickGene-Mini80 a komerčným kitom podľa pokynov výrobcu (Fujifilm, Japan). Izolovaná DNA sa skontrolovala na 0,9 % agarózovom géle a jej množstvo a čistota sa zmerali na prístroji Nanophotometer Implen (Implen, Germany). Preinkubácia sa uskutočnila pri teplote 95 °C počas 2 min.

K 2μl DNA sa pridal PCR mix, ktorý obsahoval 2,5 μl 10 x PCR buffru (Fermentas, Germany), 0,5 μl každého 10 mM deoxynukleozid trifosfátu (Fermentas), 2,0 μl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 0,25μl 5 U DreamTaq polymerázy (Fermentas) a 0,5 μl každého 10 pmol primeru (IDT, USA). Sekvencia špecifických primerov pre *Lactobacillus helveticus* (524bp):

For CTGTTTCAATGTTGCAAGTC, Rev TTTGCCAGCATTAAACAAGTCT. Amplifikácia sa uskutočnila na prístroji Thermal cycler C1000 (Biorad, USA).

V 35 cykloch sa opakovala denaturácia pri 94 °C počas 45 sekúnd, annealing pri 58 °C počas 45 sekúnd a elongácia pri 72 °C počas 1 min. Záverečný predĺžovací krok sa uskutočnil pri teplote 72 °C počas 7 min. Získané PCR fragmenty sa farbili pomocou GelRed (Biotium, USA) na 0,9 % agarózovom géle pri 120 V po dobu 15 minút a vizualizovali pod UV svetlom (Fortina et al., 2001).

#### Dôkaz kysacej, proteolytickej a lipolytickej aktivity

Kysacia aktivita vybraných izolátov laktobacilov sa sledovala cez zmenu titračnej kyslosti naočkovaného UHT mlieka počas 24 hodinovej kultivácie pri teplote 25 °C, 30 °C a 37 °C v pravidelných časových intervaloch. Proteolytická aktivita sa zistila diskovou difúznou metódou na mäsopeptonovom agare s 10 % prídavkom

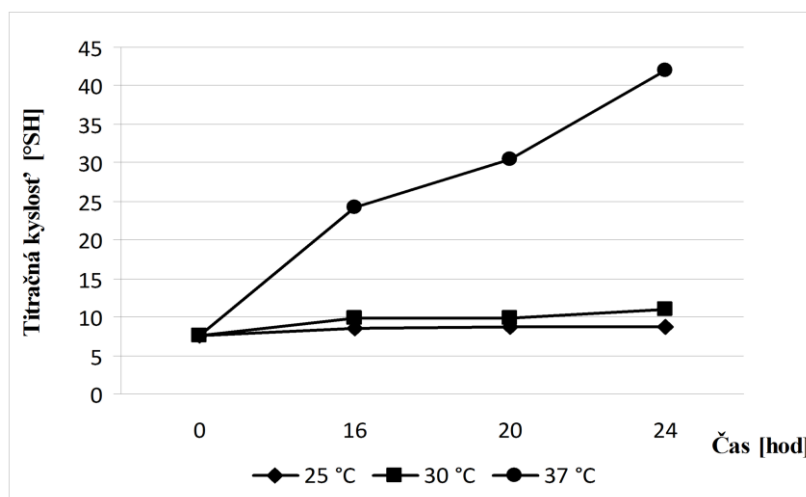
obnoveného sterilného odstredeného mlieka. Kultivácia prebehla pri teplote  $37 \pm 1$  °C po dobu 10 dní. Lipolytická aktivita sa zistila diskovou difúznou metódou na tributyrínovom agare (HiMedia Laboratories, India) s prídavkom 1 % tributyrínu. Platne sa vyhodnotili po kultivácii pri  $37 \pm 1$  °C po dobu 10 dní. K hodnoteniu uvedených aktivít sa použila 24 hodinová kultúra pomnožená v MRS bujóne s hustotou 0,5 stupňa McFarlandovej zákalovej stupnice.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

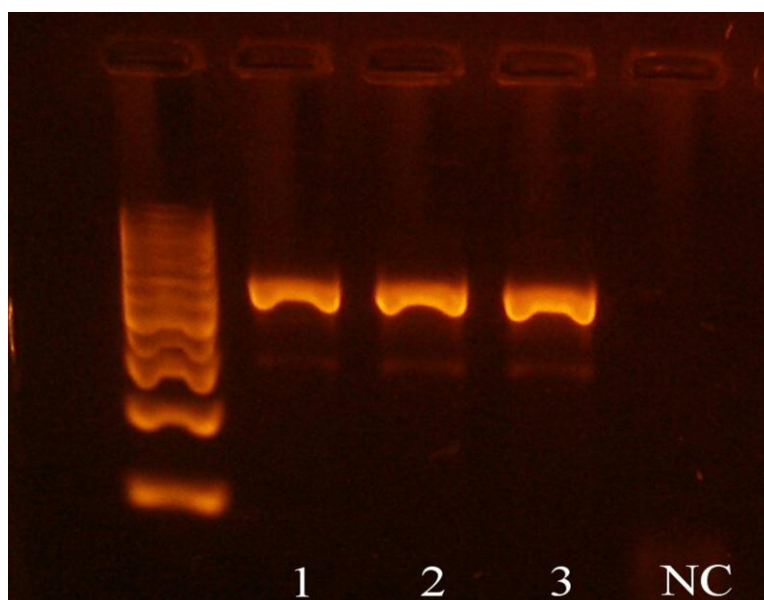
Počty laktobacilov vo vyšetrovaných vzorkách mlieka kolísali od  $5,45 \cdot 10^2$  KTJ.ml<sup>-1</sup> do  $1,89 \cdot 10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup> s priemerom  $1,54 \cdot 10^4$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Kagkli et al. (2007) uvádzajú podobné priemerné počty laktobacilov v surovom kravskom mlieku –  $1,99 \cdot 10^4$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Celkom sa izolovalo 151 izolátov z toho na základe príslušnosti podľa Grama a hodnotenia morfológického charakteru sa zistilo 81 kmeňov laktobacilov. U 9 náhodne vybraných izolátov sa hodnotila kysacia, proteolytická a lipolytická aktivita. V tabuľke 1 sú uvedené zmeny titračnej kyslosti mlieka vyvolané rôznymi kmeňmi laktobacilov v závislosti od času a teploty.

Tabuľka 1 Zmeny titračnej kyslosti mlieka spôsobené rôznymi kmeňmi laktobacilov v závislosti od času a teploty

Číslo kmeňa	Teplota [°C]	Časové intervaly v hodinách			
		0	16	20	24
		Titračná kyslosť [°SH]			
16	25	7,15	7,55	7,55	13,10
	30		7,25	7,55	9,50
	37		7,70	8,70	8,70
21	25	7,65	7,65	7,65	7,65
	30		7,65	7,65	7,65
	37		7,65	7,85	7,85
37	25	7,55	7,55	7,60	7,90
	30		7,55	7,60	8,00
	37		7,55	7,75	8,05
41	25	7,00	7,50	7,90	8,15
	30		7,00	8,05	11,30
	37		7,75	9,45	14,15
50	25	7,50	7,50	8,35	8,40
	30		8,50	8,90	11,85
	37		10,85	12,65	13,05
59	25	7,50	7,50	7,50	8,00
	30		7,50	7,50	7,50
	37		7,50	7,80	8,50
60	25	7,50	6,90	7,50	9,25
	30		7,50	8,35	9,00
	37		8,50	9,30	10,20
62	25	7,50	8,50	8,70	8,70
	30		9,75	9,90	10,95
	37		24,25	30,35	41,90
70	25	7,50	7,50	7,70	7,90
	30		8,40	8,50	8,50
	37		7,50	8,50	8,80



Obrázok 1 Priebeh zmeny titračnej kyslosti mlieka



Obrázok 2 PCR identifikácia druhu *Lactobacillus helveticus* (524bp) 100bp ladder, 1-3 amplifikované fragmenty (524bp), NC-negatívna kontrola

Zo získaných výsledkov vyplýva, že všetky sledované izoláty laktobacilov pri teplote 25 °C a 30 °C nevykazovali takmer žiadnu schopnosť prekysávať naočkovaný substrát. V jedinom prípade u kmeňa číslo 62 sa zaznamenal výrazný nárast titračnej kyslosti z počiatočných 7,5 °SH pri teplote 37 °C po 24 hodinách kultivácie na hodnotu 41,9 °SH, čo zodpovedalo hodnote pH 4,53. Priebeh zmeny titračnej kyslosti mlieka pôsobením kmeňa číslo 62 v závislosti od času a teploty je znázornený na obrázku 1.

Smetanková et al. (2011) zaznamenali pri sledovaní kysacej aktivity druhu *Lactobacillus helveticus* pokles pH naočkovaného UHT mlieka po 52 hodinách kultivácie pri 37 °C na hodnotu 3,47. *Lactobacillus helveticus* je termofilná homofermentatívna mliečna baktéria, ktorá má schopnosť produkovať veľké množstvo kyseliny mliečnej

(Borgo et al., 2007). Podľa Cascio (2010) kmeň *Lactobacillus helveticus* by sa nemal udržiavať pri teplotách nižších ako 20 °C, pretože to môže viesť k zhoršeniu kysacích schopností tejto baktérie. Aj výsledky nášho pokusu potvrdili, že pri nižších teplotách tento kmeň vykazoval slabú schopnosť fermentovať laktózu.

Podľa Drába et al. (2008) sú veľké rozdiely medzi kmeňmi druhu *Lactobacillus helveticus* v schopnosti fermentácie sacharidov, tvorby kyseliny mliečnej a v štiepení bielkovín, preto je identifikácia druhu *Lactobacillus helveticus* v rámci rodu *Lactobacillus* niekedy náročná vzhľadom k vysokej vnútrodruhovej variabilite charakteristickej pre tento druh. Táto heterogenita má za následok veľmi náročné biochemické odlišenie druhu *Lactobacillus helveticus* od fylogeneticky

příbuzných druhov ako sú *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus delbrueckii*. Na základe výsledkov druhovej identifikácie pomocou testu API 50 CHL sme predpokladali, že sa jedná o druh *Lactobacillus acidophilus* alebo *Lactobacillus helveticus*. PCR metódou sa potvrdilo, že ide o druh *Lactobacillus helveticus* obrázok 2.

## ZÁVER

Zo získaných výsledkov je možné konštatovať, že nie všetky izolované a sledované kmene laktobacilov mali dobrú kysiaciu aktivitu. Výrazná kysacia aktivita sa prejavila len u izolátu číslo 62, kde titračná kyslosť naočkovaného UHT mlieka po 24 hodinách kultivácie pri teplote 37 °C dosiahla hodnotu 41,90 °SH. U tohto kmeňa sa nezistila proteolytická a lipolytická aktivita. Aj napriek tomu tento kmeň ostane predmetom nášho ďalšieho štúdia s cieľom preskúmať ďalšie jeho pozitívne vlastnosti využiteľné pri spracovaní mlieka.

## LITERATÚRA

BAELE, M., VANEECHOUTTE, M., VERHELST, R., VANCANNEYT, C., DEVRIESE, L. A., HAESBROUCK, F. 2002. Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. In *Journal of Microbiological Methods*, vol. 50, 2002, p. 263-271.

BERTIER, F., BEUVIER, E., DASEN, A., GRAPPIN, R. 2001. Origin and diversity of mesophilic *lactobacilli* in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. In *International Dairy Journal*, vol. 11, 2001, p. 293-305.

BORGO, F., RICCI, G., MANACHINI, P. L., FORTINA, M. G. 2007. Multilocus restriction typing: A tool for studying molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* of dairy origin. In *International Dairy Journal*, vol. 17, 2007, p. 336-342.

CAGNO, R. D., QUINTO, M., CORSETTI, A., MININERVINI, F., GOBBETTI, M. 2006. Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic *lactobacilli* as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. In *International Dairy Journal*, vol. 16, 2006, p. 119-130.

CASCIO, A. 2010. *Lactobacillus helveticus*. [online]. 2010. [cit. 2010-10-26]. Retrieved from the web <[http://web.mst.edu/~microbio/bio221\\_2005/L\\_helveticus.htm](http://web.mst.edu/~microbio/bio221_2005/L_helveticus.htm)>.

DRÁB, V., KLEČACKÁ, J., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., VILÍMKOVÁ, M. 2008. Odlišení kmenů druhu *Lactobacillus helveticus* od fylogeneticky příbuzných druhů *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus acidophilus* pomocí biochemických testů a molekulárně genetických metod. In *Mlékařské listy zpravodaj*, vol. 108, 2008, p. 21-26.

FORTINA, M. G., RICCI, G., MORA, D., PARINI, C., MANACHINI, P. L. 2001. Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. In *FEMS Microbiology Letters*, vol. 198, 2001, p. 85-89.

FOX, P. F., MC SWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. 2004. *Cheese-Chemistry, Physic and Microbiology*, vol. 1, 3rd Edition. Elsevier, 2004, 617 p.

GARABAL, J. I., RODRÍGUEZ-ALONSO, P., CENTENO, J. A. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). In *LWT Food Science and Technology*, vol. 40, 2008, p. 1452-1458.

GÖRNER, F., VALÍK, E. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 p.

HOORDE, K. V., LEUVEN, I. V., DIRINCK, P., HEYNDRIKX, M., COUDIJZER, K., VANDAMME, P., HUYS, G. 2010. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, 2010, p. 226-235.

HOORDE, K. V., VERSTRAETE, T., VANDAMME, P., HUYS, G. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. In *Food Microbiology*, vol. 25, 2008, p. 929-935.

KAGKLI, D. M., VANCANNEYT, M., HILL, C., VANDAMME, P., COGAN, T. M. 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 114, 2007, p. 243-251.

KALETA, P., CALLANAN, J., O'CALLAGHAN, J., FITZGERALD, G. F., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P. 2009. Exploitation of the diverse insertion sequence element content of dairy *Lactobacillus helveticus* starters as a rapid method to identify different strains. In *Journal of Microbiological Methods*, vol. 79, 2009, p. 32-36.

KHOLIF, A. M., MAHRAN, G. A., EL-NAWAWY, M. A., ISMAIL, A. A., SALEM, M. M. E., ZAKY, W. M. 2011. Evaluation of Proteolytic Activity of Some Dairy *Lactobacilli*. In *World Journal of Dairy and Food Sciences*, vol. 6, 2011, p. 21-26.

NIETO-ARRIBAS, P., POVEDA, J. M., SESENA, S., PALOP, L., CABERAS, L. 2009. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. In *Food Control*, vol. 20, 2009, p. 1092-1098.

SÁNCHEZ, I., SESENA, S., POVEDA, J. M., CABEZAS, L., PALOP, L. 2006. Genetic diversity, dynamic, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 107, 2006, p. 265-273.

SMETANKOVÁ, J., HLADÍKOVÁ, Z., GREIF, G., GREIFOVÁ, M. 2011. Technologické vlastnosti vybraných laktobacilov majúcich antimikrobiálnu aktivitu. In *Zb. XIII. konferencie mladých vedeckých pracovníků*, VFU Brno, 2011, p. 45-47.

SMITH, G. 2003. *Dairy Processing-Improving Quality*. Woodhead Publishing, 2003, 545 p.

STN ISO 15214. 2002. *Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda stanovenia mezofilných baktérií mliečného kysnutia metóda počítania kolónii kultivovaných pri 37 °C*. Bratislava: SÚTN, 2002.

THAGE, B. V., BROE, M. L., PETERSEN, M. H., PETERSEN, M. A., BENNEDSEN, M. ARDÖ, Y. 2005. Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* strains with different aminotransferase profiles. In *International Dairy Journal*, vol. 15, 2005, p. 795-805.

TŮMA, Š., PLOCKOVÁ, M. 2007. Protektivní kultury pro výrobu polotvrdých sýrů. In *Mléko a sýry 2007 (sborník přednášek semináře)*, Praha, 2007, p. 31-36.

WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 91-109.

## Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA No. 1/0410/09.

**Contact address:**

Ing. Jana Bezeková, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: j.bezekova@gmail.com

Ing. Monika Lavová, Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: monika.lavova@gmail.com

Ing. Miroslav Kročko, PhD. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mirokrocko@yahoo.com

doc. Ing. Margita Čanigová, CSc. Slovak University of Agriculture, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Product, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Margita.Canigova@uniag.sk